

TD N° 1: LA SEPARATION DES CONSTITUANTS CELLULAIRES

Objectifs :

- Décrire les techniques couramment utilisées pour séparer les différents types de cellules et organites ;
- Connaître le principe et les types de la centrifugation.

La purification: La purification des différents organites cellulaires nécessite la fragmentation des cellules. Leurs composants sont ensuite triés sur la base de leur taille, de leur densité ou de l'expression de marqueurs spécifiques.

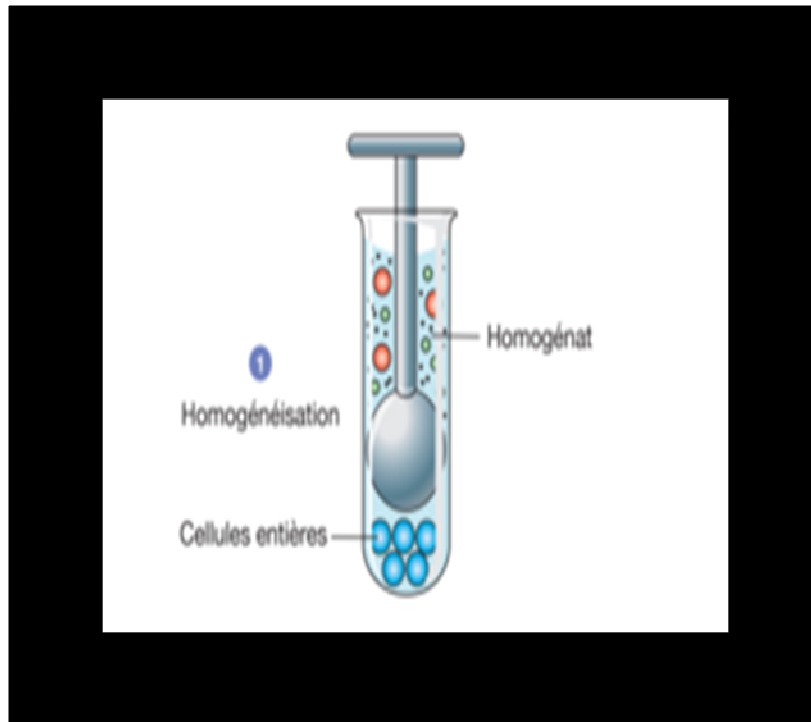
1- Homogénéisation

L'homogénéisation des cellules isolées ou dissociées des tissus sont placées en suspension dans des solutions de pH et de pression osmotique appropriés, puis la membrane cellulaire est rompue.

Pour les bactéries, levures et cellules végétales entourées d'une paroi, des enzymes adéquates sont ajoutées.

Les principales techniques d'homogénéisation utilisent :

- des broyeurs mécaniques qui fonctionnent comme des mixeurs et servent surtout à dissocier les tissus ;
- des homogénéisateurs à piston qui écrasent les cellules entre le piston et la paroi interne du tube. En fonction de leur diamètre, ils dissocient les tissus ou cassent les cellules ;
- des ultrasons qui induisent des compressions/décompressions et déstructurent très efficacement les cellules. Ce procédé de cavitation ultrasonore est souvent appelé « sonication » ;
- des homogénéisateurs sous pression (type bombe à azote ou presse de French), des cycles de congélation/décongélation.



2- La séparation par centrifugation

Le développement de centrifugeuses à haute vitesse, ou ultracentrifugeuses, imposant des accélérations supérieures à 20 000 fois la pesanteur terrestre (20 000 g) a permis le fractionnement subcellulaire. La vitesse de sédimentation des particules dépend de leur taille, de leur forme (globulaire ou allongée) et de leur densité, elle est quantifiée par le coefficient de sédimentation donné en unités Svedberg (S).

La centrifugation différentielle (figure 1)

Les particules sédimentent à une vitesse donnée, en fonction de leur taille et de leur densité, dans le tampon d'homogénéisation. Le procédé de purification des composants cellulaires peut être réalisé en plusieurs étapes, le surnageant étant chaque fois centrifugé plus vite et plus longtemps. La centrifugation sur gradient de densité (figure 2) L'échantillon est déposé sur un gradient de densité puis centrifugé à une vitesse adaptée à la séparation des particules d'intérêt. Les molécules utilisées pour former les gradients peuvent être des sucres (saccharose), des sels métalliques (chlorure de césium CsCl), des colloïdes (Percoll). Il faut distinguer la centrifugation zonale de la centrifugation à l'équilibre.

• Lors d'une centrifugation zonale, la densité maximale du gradient est inférieure à la densité maximale des particules. Il y a donc une séparation basée sur la vitesse de sédimentation. La durée est contrôlée pour que les particules ne sédimentent pas jusqu'au fond du tube.

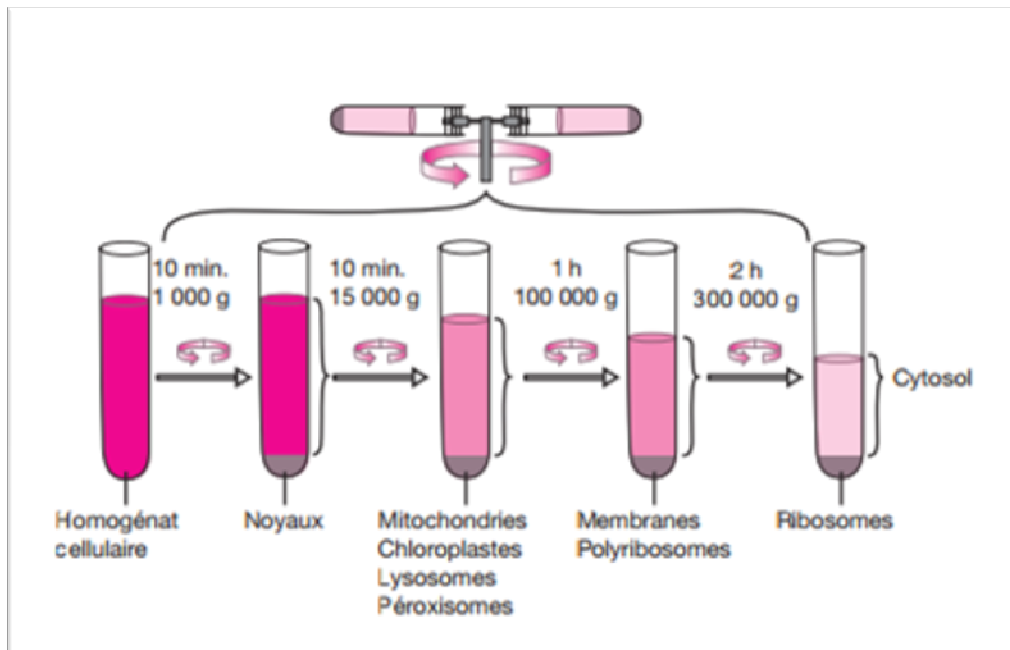


Figure 1 : Les principales étapes de la centrifugation différentielle d'un homogénat cellulaire

Lors d'une centrifugation à l'équilibre (isopycniq) ultracentrifugation, la densité maximale à la base du gradient est supérieure à la densité maximale des particules. La séparation est basée sur la densité. La durée de centrifugation peut être très longue jusqu'à ce qu'un équilibre soit atteint. Dans ces procédures, le gradient peut être continu ou discontinu, on parle alors de centrifugation « sur coussin ». Avec le chlorure de césium utilisé pour séparer différentes formes d'acides nucléiques (ADN génomique, plasmidique, ARN), le gradient n'est pas préformé. L'échantillon est mélangé à une solution concentrée de CsCl puis, au cours de la centrifugation, un gradient de CsCl chlorure de césium se forme ce qui entraîne la séparation des acides nucléiques.

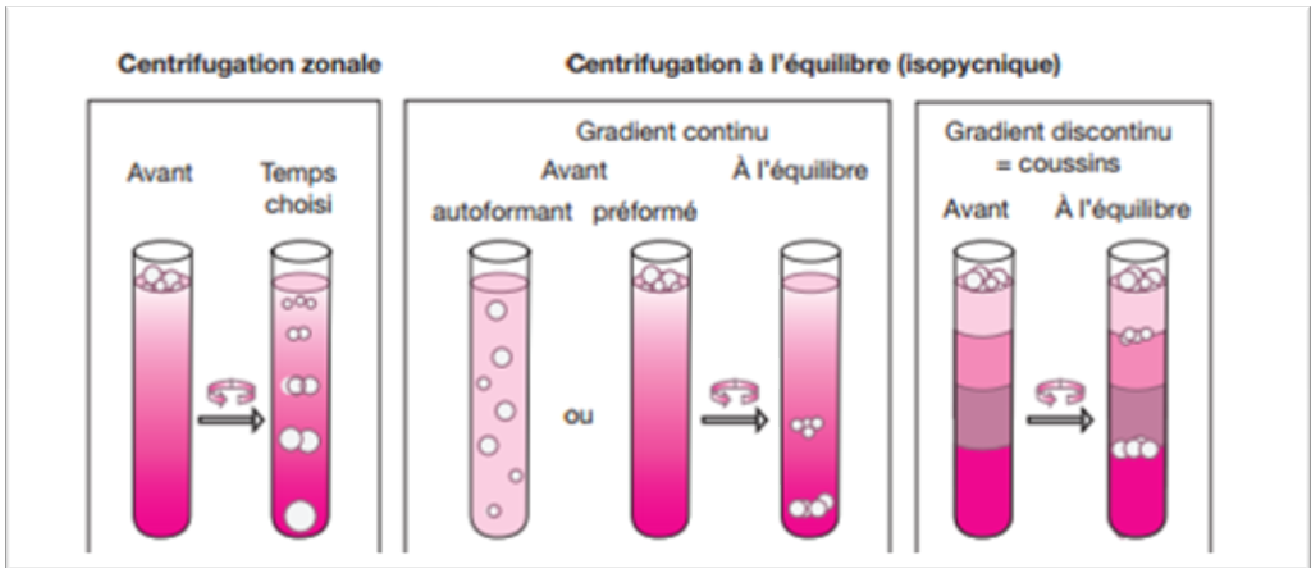


Figure 2 : Les différents types de centrifugation sur gradient